

乙酰氧基胡椒酚乙酸酯亚微乳对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响^A

华海婴^{1*}, 游晓英^{1,2}, 乔淑会^{1,2}, 刘丹^{1,2}, 赵永星^{2#}(1. 郑州大学医药科学研究所, 郑州 450052; 2. 郑州大学药学院, 郑州 450001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4243-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.07

摘要 目的: 研究乙酰氧基胡椒酚乙酸酯(ACA)亚微乳对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。方法: 以处于对数生长长期的人肝癌 HepG2 细胞为模型, 采用 MTT 比色法检测 5、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ ACA 亚微乳和 ACA 原料药作用 24、48、72、96 h 后对细胞增殖的影响, 计算半数抑制浓度(IC_{50}); 流式细胞仪检测分析 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ ACA 亚微乳和 ACA 原料药作用 48 h 后细胞的周期分布和凋亡率。结果: 与 ACA 原料药比较, ACA 亚微乳对 HepG2 细胞的增殖抑制作用更明显($P < 0.05$), 且呈浓度和时间依赖性; 作用于细胞 24、48、72、96 h 后, ACA 原料药的 IC_{50} 分别为 160.05、135.56、124.18、109.30 $\mu\text{mol/L}$, ACA 亚微乳的 IC_{50} 分别为 74.89、29.36、16.80、7.32 $\mu\text{mol/L}$ 。ACA 亚微乳可显著影响 HepG2 细胞周期的进程, 使 G_0/G_1 期细胞减少、S 期细胞增多; 同等条件下, 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ ACA 亚微乳作用后细胞的凋亡率[(34.60 \pm 0.73)%、(40.30 \pm 1.75)%、(50.60 \pm 2.12)%]均明显高于 ACA 原料药作用后细胞的凋亡率[(8.10 \pm 1.58)%、(11.80 \pm 1.62)%、(38.50 \pm 0.47)%]($P < 0.05$)。结论: 与 ACA 原料药比较, ACA 亚微乳对 HepG2 细胞增殖的抑制作用更强, 促凋亡作用更显著。

关键词 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯; 亚微乳; 原料药; HepG2 细胞; 增殖; 凋亡

Effects of Acetoxychavicol Acetate Submicron Emulsion on the Proliferation and Apoptosis of Human Liver Cancer HepG2 Cells

HUA Hai-ying¹, YOU Xiao-ying^{1,2}, QIAO Shu-hui^{1,2}, LIU Dan^{1,2}, ZHAO Yong-xing²(1. Academy of Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of acetoxychavicol acetate (ACA) submicron emulsion on the proliferation and apoptosis of human liver cancer HepG2 cells. **METHODS:** The proliferation of HepG2 cells at logarithmic growth phase was assayed by MTT after treated with 5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ ACA submicron emulsion and ACA raw material for 24, 48, 72 and 96 h; IC_{50} of ACA was calculated. Flow cytometry was used to detect the apoptosis and cell cycle of HepG2 cells after treated with 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ ACA submicron emulsion and ACA raw material for 48 h. **RESULTS:** Compared with ACA raw material, ACA submicron emulsion could significantly inhibit the proliferation of HepG2 cells in a time and dose-dependent manner ($P < 0.05$); IC_{50} of ACA raw material were 160.05, 135.56, 124.18 and 109.30 $\mu\text{mol/L}$, and those of ACA submicron emulsion were 74.89, 29.36, 16.80 and 7.32 $\mu\text{mol/L}$ after treated for 24, 48, 72 and 96 h. ACA submicron emulsion could influence the cell cycle of HepG2 cells significantly; the number of HepG2 cells at G_0/G_1 phase decreased while the number of HepG2 cells at S phase increased. Under the same conditions, the apoptotic rates of HepG2 cells after treated with 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ ACA submicron emulsion [(34.60 \pm 0.73)%、(40.30 \pm 1.75)%、(50.60 \pm 2.12)%] were significantly higher than those of HepG2 cells after treated with ACA raw material [(8.10 \pm 1.58)%、(11.80 \pm 1.62)% and (38.50 \pm 0.47)%] ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** The inhibitory effect of ACA submicron emulsion on the proliferation of HepG2 cells and promotion effect of it on the apoptosis of cells both are better than ACA raw material.

KEY WORDS Acetoxychavicol acetate; Submicron emulsion; Raw material; HepG2 cells; Proliferation; Apoptosis

肝癌(Hepatocellular carcinoma)是位居全球恶性肿瘤发病率第5位、死亡原因第3位的恶性肿瘤^[1]。由于缺乏敏感性和特异性致使其早期诊断很困难,临床肝移植、手术切除以及放射治疗的复发率较高,药物治疗易产生耐药性,致使肝癌临床治疗总体疗效较差、死亡率高。目前,发现对其具有敏感特异

^A 基金项目:河南省重点科技攻关计划项目(No.112102310022);郑州市科技计划项目(No.121PPTGG506-3)

* 研究员,硕士研究生导师,硕士。研究方向:抗肿瘤药物新制剂及其药理学。电话:0371-66658210。E-mail:hhylu@aliyun.com

通信作者:教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:抗癌药物递药系统。电话:0371-67781901。E-mail:zhaoyx@zzu.edu.cn

的新型药物是肝癌治疗的主要任务^[2]。乙酰氧基胡椒酚乙酸酯(ACA)是从姜科植物大高良姜根茎里提取分离的小分子化合物^[3]。研究表明,ACA能有效抑制肿瘤形成,且对大多数肿瘤均有效,但ACA在水中溶解度小,且易水解、不稳定,限制了其研究和临床应用。而将ACA制成亚微乳剂,则可提高其溶解度,增加其在作用靶点的药物浓度^[4],使体内作用明显增强。本文以人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,考察 ACA 亚微乳对 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响。

1 材料

1.1 仪器

酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);流式细胞仪(美国 Beckman

Couter 公司)。

1.2 药品与试剂

ACA 原料药(华南理工大学理学院应用化学系提供,批号:20100918,纯度:≥97.0%);ACA 亚微乳(郑州大学医药科学研究所自制,批号:20120419,载药量:877.3 μg/ml);MTT 和二甲亚砜(DMSO)均来源于美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物有限公司);细胞周期染色试剂盒和 Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡试剂盒均购自杭州联科生物公司。

1.3 细胞

人肝癌 HepG2 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 细胞采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基贴壁培养,条件为 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度,每 2~3 d 换液传代一次,取对数生长期细胞进行试验。

2.2 细胞增殖的检测

采用 MTT 比色法,取 HepG2 细胞以 0.25% 胰蛋白酶消化后,制成细胞数为 $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl,置于培养箱中培养,24 h 后弃上清液,分别按 ACA 亚微乳组、ACA 原料药组、空白对照组(含细胞的培养液)和调零组(只含培养液)进行处理。ACA 亚微乳组分别加入 5、10、20、40、80、160 μmol/L ACA 亚微乳;ACA 原料药组分别加入相同浓度的 ACA 原料药,每孔 200 μl,每个浓度设 5 个复孔;空白对照组和调零组均设 5 个复孔。各组细胞分别培养 24、48、72、96 h 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续培养 4 h,弃培养液,每孔加入 150 μl DMSO 溶液,避光震荡 10 min。用酶标仪检测光密度(OD)值,OD 值越大,细胞增殖越明显。检测波长为 490 nm,参考波长为 630 nm,计算半数抑制浓度(IC₅₀),以上试验重复 3 次。

2.3 细胞周期的检测

取对数生长期 HepG2 细胞,常规消化后制成单细胞悬液,将细胞数调整为 $15 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$,接种于 6 孔板中,每孔 1 ml。试验分为 ACA 亚微乳组、ACA 原料药组和空白对照组。ACA 亚微乳组分别加入 20、40、80 μmol/L ACA 亚微乳,ACA 原料药组分别加入相同浓度的 ACA 原料药,空白对照组加入相同容积的含血清培养基。培养 48 h 后胰酶消化收集细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,按照细胞周期染色试剂盒说明书操作处理细胞,并用流式细胞仪检测分析细胞的周期分布。

2.4 细胞凋亡的检测

收集“2.3”项下培养 48 h 后的细胞,洗涤、离心,按照 AnnexinV-PI 细胞凋亡试剂盒说明书进行检测,用流式细胞仪和 Cell Quest 软件分析细胞的凋亡情况。结果判断依据:FITC-/PI- 为活细胞,FITC-/PI+ 为坏死细胞,FITC+/PI- 为凋亡细胞,FITC+/PI+ 为凋亡后继发死亡的细胞^[5]。按公式[细胞凋亡率=(凋亡细胞数+继发死亡细胞数)/全部细胞数×100%]计算细胞凋亡率。

2.5 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。所有数据均为 3 次及以上独立试验结果,以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数的比较采用两独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖情况

ACA 亚微乳和 ACA 原料药对 HepG2 细胞的增殖均有抑制作用,且抑制作用与浓度呈正相关,与时间呈负相关。作用时间相同时,与空白对照组比较,各浓度 ACA 亚微乳作用后细胞的增殖作用明显降低($P < 0.05$),除作用 24 h 和 5 μmol/L 外其余 ACA 原料药作用后细胞的增殖作用明显降低($P < 0.05$)。作用浓度相同时,作用时间越长,细胞增殖越明显。相同条件下,与 ACA 原料药比较,各浓度 ACA 亚微乳作用后细胞增殖作用明显更低($P < 0.05$)。作用细胞 24、48、72、96 h 后,ACA 原料药的 IC₅₀ 分别为 160.05、135.56、124.18、109.30 μmol/L,ACA 亚微乳的 IC₅₀ 分别 74.89、29.36、16.80、7.32 μmol/L。各组细胞的增殖情况见表 1。

表 1 各组细胞的增殖情况($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Proliferation of HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	c, μmol/L	OD 值			
		24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	0	0.261±0.008	0.399±0.01	0.693±0.002	0.945±0.016
ACA 原料药组	5	0.254±0.013	0.375±0.016	0.643±0.015	0.829±0.018*
	10	0.248±0.008	0.369±0.012	0.630±0.009*	0.799±0.004*
	20	0.242±0.015	0.366±0.007	0.622±0.013*	0.781±0.012*
	40	0.239±0.016	0.343±0.003*	0.577±0.016*	0.745±0.014*
	80	0.217±0.001	0.308±0.002*	0.519±0.006*	0.612±0.009*
	160	0.127±0.002*	0.152±0.012*	0.225±0.008*	0.258±0.013*
ACA 亚微乳组	5	0.196±0.007*	0.295±0.004**	0.502±0.011**	0.550±0.017**
	10	0.183±0.012**	0.260±0.020**	0.435±0.022**	0.378±0.016**
	20	0.165±0.011**	0.215±0.018**	0.311±0.017**	0.140±0.028**
	40	0.150±0.032**	0.185±0.029**	0.247±0.024**	0.071±0.025**
	80	0.129±0.008**	0.139±0.011**	0.182±0.019**	0.063±0.015**
	160	0.078±0.004*	0.063±0.002**	0.089±0.006**	0.045±0.005**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ACA 原料药组比较: # $P < 0.05$

vs. blank control group: * $P < 0.05$; vs. ACA raw material group: # $P < 0.05$

3.2 细胞周期分布情况

与空白对照组比较,各浓度 ACA 亚微乳和 ACA 原料药作用后细胞 G₀/G₁ 期细胞比例明显减少($P < 0.05$),S、G₂/M 期细胞比例明显增加(除 20、40 μmol/L ACA 亚微乳组 G₂/M 期外 $P < 0.05$),且与浓度呈正相关。各组细胞的周期分布见图 1,数据见表 2。

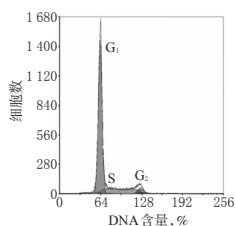
3.3 细胞凋亡情况

ACA 亚微乳和 ACA 原料药均能促进 HepG2 细胞的凋亡,且与浓度呈正相关。与空白对照组比较,各浓度 ACA 亚微乳和 ACA 原料药作用后细胞凋亡率均明显增加($P < 0.05$),且 ACA 亚微乳促细胞凋亡作用强于 ACA 原料药($P < 0.05$)。各组细胞的凋亡散点图见图 2,各组细胞的凋亡各组细胞的凋亡率比较见表 2。

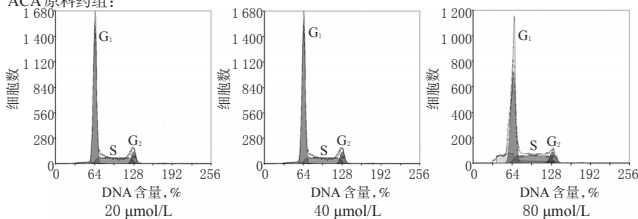
4 讨论

国内外很多文献^[6-7]证实 ACA 具有多种生物学活性,如抗肿瘤、抗氧化、抗菌消炎、抑制人类免疫缺陷病毒(HIV)活性和治疗胃溃疡等,具有广阔的应用前景。由于 ACA 具有一定的脂溶性,笔者将其制备成亚微乳剂,提高了 ACA 的溶解度和稳定性。目前 ACA 亚微乳的处方制备工艺已经相对成熟,且体内药效学结果证明,ACA 亚微乳抑瘤作用明显优于对照药 5-氟尿嘧啶和 ACA 原料药,并表现出一定的量效关系^[1]。

空白对照组:



ACA 原料药组:



ACA 亚微乳组:

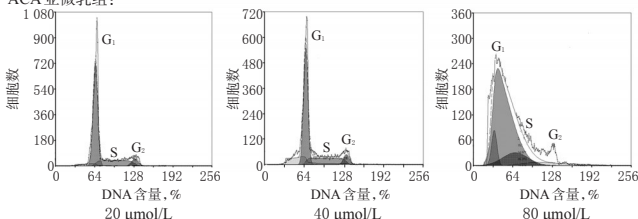
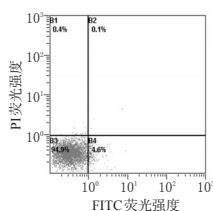


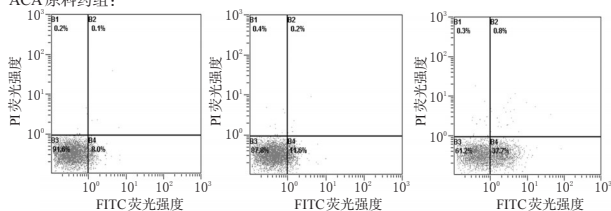
图1 各组细胞的周期分布

Fig 1 Cycle distribution of HepG2 cells in each group

空白对照组:



ACA 原料药组:



ACA 亚微乳组:

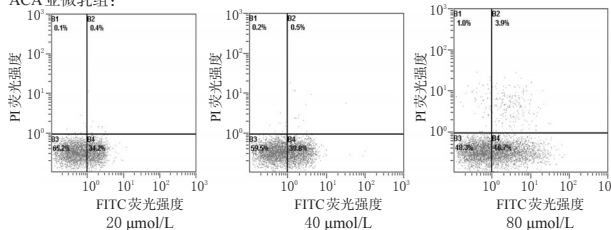


图2 各组细胞的凋亡散点图

Fig 2 Scatter diagram of HepG2 cells in each group

Awang K 等^[8]研究结果表明,ACA 对部分人肿瘤细胞的毒性作用呈时间和浓度依赖性,且对正常细胞没有毒性作用,其主要通过诱导细胞凋亡致肿瘤细胞的死亡。本试验结果也证实了以上结论:与 ACA 原料药比较,ACA 亚微乳对人肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用和促凋亡效应都更为显著。细胞周期调控异常与肿瘤的发生密切相关^[9],抗癌药物通过对细胞周期分布的干预阻滞细胞周期活动,从而诱导细胞凋亡。本

表2 各组细胞的周期分布和凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Cycle distribution and apoptotic rate of HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度, μmol/L	细胞量,%			细胞凋亡率,%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
空白对照组	0	75.21 ± 1.32	20.39 ± 0.41	4.40 ± 0.98	4.70 ± 0.97
ACA 原料药组	20	65.28 ± 0.83*	26.58 ± 0.64*	8.14 ± 0.75*	8.10 ± 1.58*
	40	64.65 ± 2.25*	27.04 ± 2.98*	8.31 ± 2.20*	11.80 ± 1.62*
	80	59.03 ± 2.67*	31.93 ± 1.75*	9.04 ± 0.91*	38.50 ± 0.47*
ACA 亚微乳组	20	69.25 ± 1.62**	23.84 ± 1.02**	6.91 ± 1.49	34.60 ± 0.73**
	40	65.02 ± 3.50*	27.42 ± 3.37*	7.56 ± 2.14	40.30 ± 1.75**
	80	8.34 ± 1.37**	76.87 ± 5.32**	14.79 ± 2.35**	50.60 ± 2.12**

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ACA 原料药组比较: # $P < 0.05$

vs. blank control group: * $P < 0.05$; vs. ACA raw material group:

$P < 0.05$

试验结果显示,ACA 亚微乳可使 HepG2 细胞增殖速度明显加快,导致 G₀/G₁ 期细胞减少、S 期细胞增多,从而显著影响 HepG2 周期活动的进程,将细胞阻滞在 S 期,阻止细胞从 S 期向 G₂ 期的过渡,发挥其抑制增殖和诱导凋亡作用。但其具体作用机制还有待进一步研究。

综上所述,与 ACA 原料药比较,ACA 亚微乳对 HepG2 细胞的增殖抑制作用更强,促凋亡作用更显著,是一种极具研发潜力的抗肿瘤制剂。

参考文献

- [1] Lau WY, Lai EC. Hepatocellular carcinoma: current management and recent advances[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008, 7(3): 237.
- [2] Cheung JY, Ong RC, Suen YK, et al. Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells[J]. *Cancer Lett*, 2005, 217(2): 203.
- [3] Yang X, Eilerman RG. Pungent principal of *Alpinia galangal* (L.) Swartz and its applications[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(4): 1657.
- [4] 华海婴, 杨婷, 赵永星. 乙酰氧基胡椒酚乙酸酯亚微乳的制备及其性质考察[J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2424.
- [5] 焦志军, 王文红, 杨友. Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测结直肠癌细胞凋亡[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2005, 15(2): 97.
- [6] Niyomkam P, Kaewbumrung S, Kaewpparat S, et al. Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism[J]. *Pharm Biol*, 2010, 48(4): 375.
- [7] Ye Y, Li B. 1'-S'-1'-acetoxychavicol acetate isolated from *Alpinia galanga* inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking Rev transport[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(Pt 7): 2047.
- [8] Awang K, Azmi MN, Aun LI, et al. The apoptotic effect of 1'-s'-1'-acetoxychavicol acetate from *Alpinia conchigera* on human cancer cells[J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 8048.
- [9] Rodriguez-Nieto S, Zhivotovsky B. Role of alterations in the apoptotic machinery in sensitivity of cancer cells to treatment[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(34): 4411.

(收稿日期: 2013-02-26 修回日期: 2013-05-22)